LCafé

HPLCからもっと情報発信

エル・シー・カフェ

春眠号

2011 No.17

CONTENTS

p.2～4
【コラム】カラムも春眠!?
～カラムの長期保管方法～

p.5～7
【アプリケーションデータ紹介】
～パルス式電気化学検出器（PAD）の魅力～

p.7
編集後記

SHISEIDO

1 カラムも春眠!? ～カラムの長期保管方法～

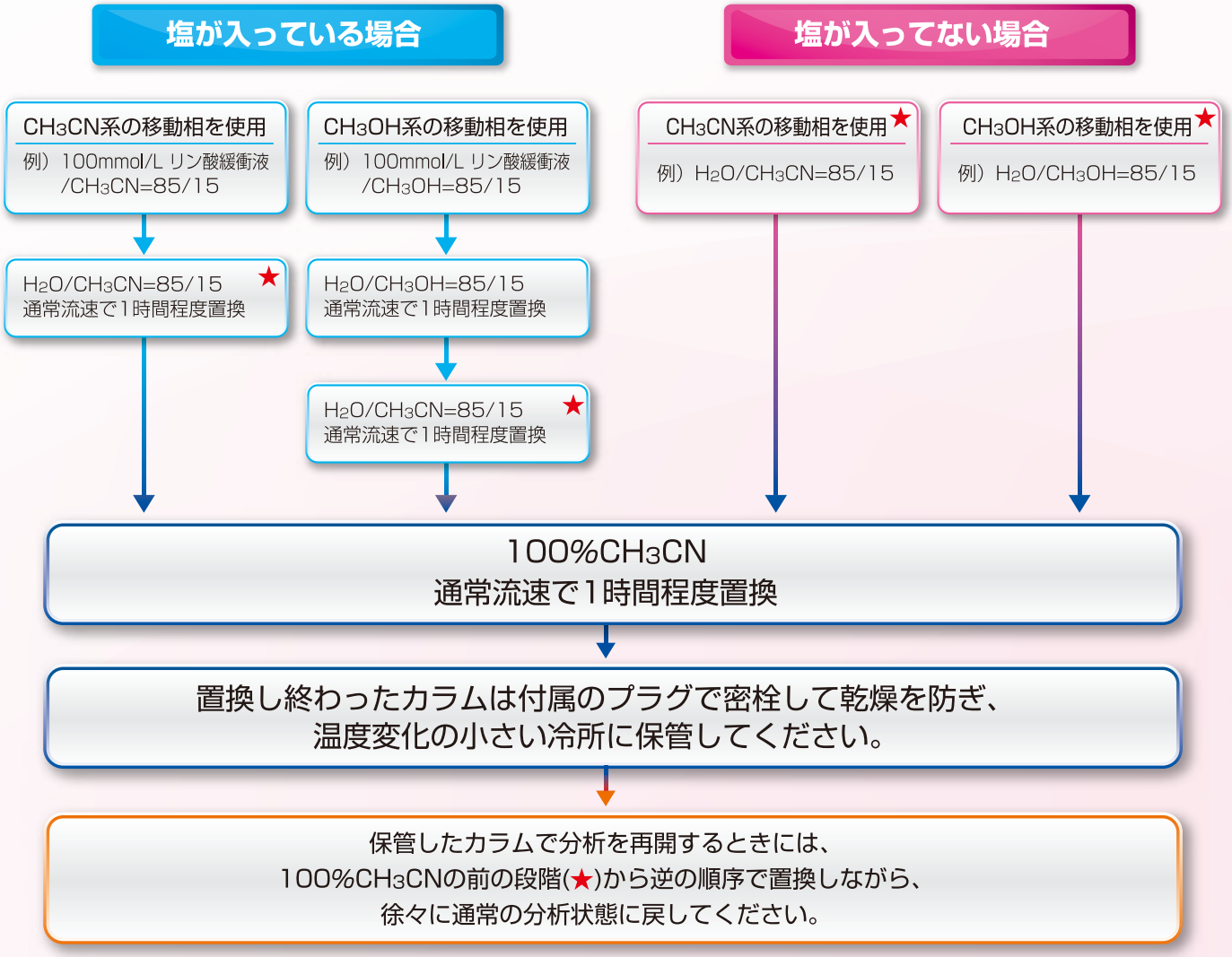
春になり新たな年度始まりと共に、新しい分析をすることもあるのではないでしょうか。今までお世話になったカラムとはしばしのお別れかも知れません。次にカラムと会うときも前と同じように使いたいもの。しばらくお休みするカラムはどうのようにして保管してあげるとよいのでしょうか。今回は、皆さまからお問い合わせの多い、C_{18}カラム、CAPCELL PAK CR、PC HILICの長期保管方法についてお話いたします。

※C_{18}カラムの長期保管方法についてはLC café No.10にも掲載しています。

基本的には出荷時溶媒に戻して保管しますが、それぞれのカラムの特徴にあわせて手順が異なってきます。それぞれのカラムについて、以下のフローチャートをご覧下さい。

ポイントは、塩の析出を防ぐこと、また、急に出荷時溶媒を流さないことです。

C_{18}の長期保管方法 （※1ヶ月以上保管する場合）



CAPCELL PAK CRの長期保管方法

（※1ヶ月以上保管する場合）

※移動相には塩を添加して分析

CH3CN系の移動相を使用
例）100mmol/L リン酸緩衝液/CH3CN=85/15

CH3OH系の移動相を使用
例）100mmol/L リン酸緩衝液/CH3OH=85/15

H2O/CH3CN=85/15 ★
通常流速で1時間程度置換

H2O/CH3OH=85/15
通常流速で1時間程度置換

H2O/CH3CN=85/15 ★
通常流速で1時間程度置換

100%CH3CN
通常流速で1時間程度置換

置換し終わったカラムは付属のプラグで密栓して乾燥を防ぎ、
温度変化の小さい冷所に保管してください。

保管したカラムで分析を再開するときには、100%CH3CNの前の段階(★)から逆の順序で置換しながら、
徐々に通常の分析状態に戻してください。

PC HILICの長期保管方法

（※1ヶ月以上保管する場合）

※CH3CN系の移動相（60%以上のCH3CNを使用）で分析

塩が入っている場合

CH3CN系の移動相を使用
例）50mmol/L リン酸緩衝液/CH3CN=85/15

塩が入ってない場合

CH3CN系の移動相を使用
例）H2O/CH3CN=40/60

H2O/CH3CN=85/15 ★
通常流速で1時間程度置換

H2O/CH3CN=10/90
通常流速で1時間程度置換

置換し終わったカラムは付属のプラグで密栓して乾燥を防ぎ、
温度変化の小さい冷所に保管してください。

保管したカラムで年が明けて分析を再開するときには、H2O/CH3CN=10/90の前の段階(★)から
逆の順序で置換しながら、徐々に通常の分析状態に戻してください。

- 普段の分析が終わる毎にこのような手順を行う必要はありません。むしろカラムの寿命を縮める可能性もあります。
- TFA等有機系の強酸やアルカリ（pH＞8）を含む溶媒を使用した場合は、その溶媒と同一組成の有機溶媒と水の混液で置換してください。また、水のみでの置換は避けてください。
- 置換し終わったら、カラムの密栓をして乾燥に注意して保管してください。

これらの手順と注意点にご留意いただき、みなさまの大切な分析を支えるカラムを長期間安定的にお使いただければと思います。

しかしながら、このように大切に扱ってきたカラムであっても、いつかは劣化し寿命がやってきます。その“カラムの劣化の見極め”についてもよくお問い合わせをいただきますので、ご紹介いたします。

【アルカリによる劣化の場合】

シリカゲル担体が溶解するため、ピークのリーディングやボイドの発生によるピークの崩れなどが見られます。

【酸による劣化の場合】

アルキル基の切断による保持の減少が見られます。

【充填剤の汚れによる劣化の場合】

保持の減少やピークの崩れ、カラム圧の上昇、分離の低下などが見られます。

※そのほかの情報は、資生堂HPLCウェブサイト掲載の、「液クロQ&A」をご覧ください。

※カラムの取り扱いについては、資生堂HPLCウェブサイト(❶)に掲載しいている、各カラムの製品紹介ページ(❷)をご覧ください。

※複数あるタブの中の「取扱説明書(❸)」をご覧ください。

❶

❷

❸

2

アプリケーションデータ紹介

～パルス式電気化学検出器（PAD）の魅力～

私たちの身近に存在し、食品から医療まで多くの分野での分析対象となっている親水性物質の代表である糖類は、思いのほか分析が難しい物質のひとつです。一般的な逆相モードでは保持できず、発色団も持たないためそのままでは検出できません。一般的には、順相モードにより示差屈折計（RI）などを用いて測定しますが、RIはグラジェント溶出ができず、すべての共雑物を検出してしまう選択性のない低感度な検出方法です。

パルス式電気化学検出器（英語名：pulsed amperometric detector, PAD）は、電気化学検出器の一種です。強アルカリ性の液を流しながら金電極にパルス状の電位を与えることで糖を検出することを特長とします。糖類に関しては、RIより10～100倍以上の感度を得ることができます。

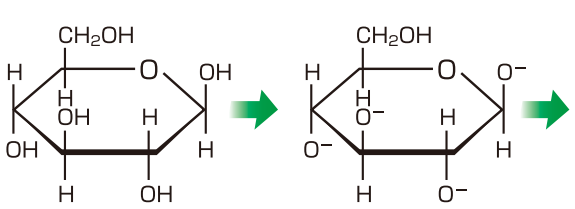
今回は、この糖分析に重宝するPADについてお話します。

PADはどんな化合物を分析する検出器?

脂肪族の水酸基に反応します。糖類を含めた水酸基を持つ化合物（単糖、アミノ糖、糖アルコール、オリゴ糖）の分析に使えます。アミノ酸に応用した結果も報告されています。

PADを使用する時に、アルカリ溶液と金電極を使用するのはどうして?

糖類のpKaは12～13付近にあるため、強アルカリ性条件下ではプロトンを乖離し、“酸”の様に振る舞います。この負に帯電した部位と電極表面の金が接近すると電気化学特性を持つ物質となり、電気化学反応（酸化）を起こします。



糖類の酸解離定数
（25℃、pH 7の水中）

グルコース	pKa 12.28
フルクトース	pKa 12.03
キシロース	pKa 12.15

PADはパルスを使用するのは何故?

この酸化反応で生ずる生成物が数秒で電極表面を不活性にしてしまうことが知られています。しかし、数秒以内に逆の電位をかけるとこの生成物は取り除くことが出来ます。測定をするための電位、表面を再び活性化するための電位の両方を瞬時にかつ連続的に用いるためにパルスを使います。

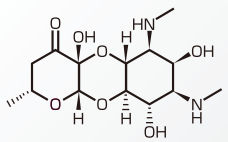
PADを使ったアプリケーションデータ

PADを用いた糖分析に用いるカラムとしては、SUCREBEAD Ⅰ・SUCREBEAD Ⅱ（アニオン交換モード）、CAPCELL PAK NH_2（HILICモード）、CAPCELL PAK C_{18} (逆相モード)があり、目的とする糖の種類に応じて使い分けることができます。

今回はCAPCELL PAK C_{18}（逆相モード）を用いたアプリケーション例を示します。

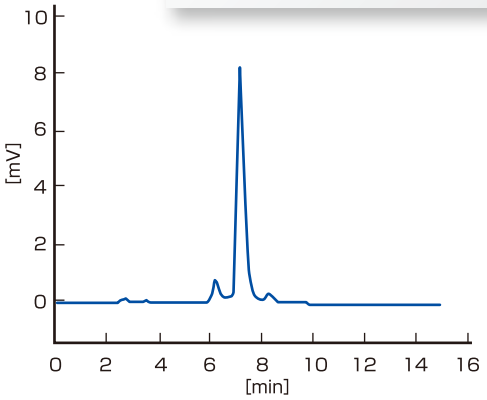
スペクチノマイシン分析

スペクチノマイシンは静菌性抗生物質でアミノ配糖体と関連がある化合物です。
ヨーロッパ薬局方（European Pharmacopoeia：EP）ではPAD法が指定されており、EP法の条件を参考に分析しました。



Spectinomycin
$C_{14}H_{24}N_2O_7$
M.W.：332.35

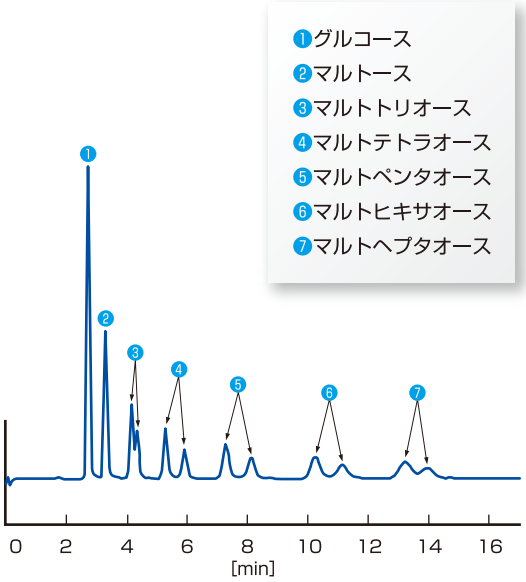
【HPLC条件】
カラム　：CAPCELL PAK C_{18} MG S5 2.0 mm i.d.× 250 mm
移動相　：4.2g of Oxalic acid, and 2mL of heptafluorobutyric acid were dissolved into 1L of water, and then adjusted at pH 3.5 with NaOH. The solution and acetonitrile were mixed at 85 / 15.
流　速　：200 μL/min
pH調整液：1mol/L NaOH 400 μL/min
温　度　：40℃
検　出　：PAD
注入量　：2 μL
試　料　：100 μg/mL



マルトオリゴ糖

糖類は水溶液中ではアノマー平衡状態で存在します。マルトオリゴ糖をODSカラムで取得した場合、三糖以上のオリゴ糖にてアノマー分離が達成されます。このアノマーの平衡速度の差および充填剤表面のC_{18}基との相互作用におけるエネルギーの差（相互作用により自由エネルギーが低下するほうが保持は大きくなります。）によるものと思われます。

【HPLC条件】（参考データ）
カラム　：CAPCELL PAK C_{18} AQ S5 4.6 mm i.d. × 250 mm
移動相　：H_2O
流　速　：1 mL / min
pH調整液：1mol/L NaOH 600 μL/min
温　度　：20℃
検　出　：PAD
試　料　：100 μg/mL



PADならNANOSPACE！

NANOSPACEのPADはアナログ信号の出力端子が装備されています。現在ご使用されているHPLC装置にPADのみ接続可能です。データ処理装置にアナログ入力端子がない場合、A/Dコンバーターを併用することで接続が可能となります。

NANOSPACEのポンプやオートサンプラーはアルカリ溶液を使用できる材質（PEEK）を使用していますので糖分析システムとしてオススメです。

製品番号	3016
製 品 名	パルス式電気化学検出器
標準価格	1,800,000円

※PADや糖分析に関するより詳しい情報は、資生堂HPLCのウェブサイト掲載の、テクニカルノート研究開発コラム「資生堂の糖分析Ⅰ」「資生堂の糖分析Ⅱ」をぜひご覧ください。

http://www.shiseido.co.jp/hplc2003/note/html/col_index.htm

3 編集後記

LC café No.17はいかがでしたか。カラムも少しお休みするときにはぜひコラムページをご参考にしていただければと思います。

表紙の犬もなんとも気持ちよさそうに眠っていますね。“春眠暁を覚えず”といった雰囲気に久々に昔習った漢詩が頭に蘇ってきました。

【春暁】　孟浩然

春眠不覺暁　（春眠暁を覚えず）
處處聞啼鳥　（処処（しょしょ）啼鳥（ていちょう）を聞く）
夜来風雨聲　（夜来（やらい）風雨の声）
花落知多少　（花落つること知るや多少（いくばく））

眠っている間に分析が終わってくれていたらいいなぁ・・・。それはぜひ『NANOSPACEオートサンプラー』がお手伝いいたします！
次回もお楽しみに。

（編集T.I）

Sマイルによる義援金並びにNANOSPACEの停止及び起動操作についてのご案内

東北地方太平洋沖地震により被害を受けられた皆さまに、
謹んでお見舞い申し上げますとともに、
一日も早い復旧・復興を心よりお祈り申し上げます。

下記の2点を、資生堂HPLCウェブサイトにて新たにご案内を掲載しております。

★ Sマイル会員のみなさまへ

Sマイルポイントで、『**東北地方太平洋沖地震　復旧支援ポイント募金**』が可能となりました。お申込みは、下記Sマイルクラブホームページの左側「プレゼントカタログ」ボタンをクリックいただき、以下のどちらかの方法で検索を行ってください。

みなさまが保有のSマイルポイントが被災地復旧のお役立ていただければと思っております。ご協力の程よろしくお願い申し上げます。

※皆様からご寄付いただいたポイントは、日本赤十字社を通して、被災者の方々の援助に使わせていただきます。

＜商品番号検索＞【９９９９９９】と入力
＜カタログ検索＞ 以下の順に選択
【すべてのカタログ】→【チケット・チャリティー・ポイント移行】→【チャリティー】

▶Sマイルクラブホームページ：http://www.j-point.org/shiseido/

★震災により被害を受けられた地域の皆さまへ、また計画停電により停電する地域の皆さまへ

NANOSPACE SI-2（SI-1を含む）の停止及び起動手順を掲載いたしました。
PDFファイルにてご案内しておりますので、お役立てください。

発行元
SHISEIDO 株式会社 資生堂
フロンティアサイエンス事業部

■東日本営業
〒105-0021 東京都港区東新橋1-1-16　汐留FSビル
TEL：03-6253-1412　FAX：03-6253-1416

■西日本営業
〒601-8037 京都市南区東九条西河辺町12
TEL：075-671-0301　FAX：075-671-0302

http://www.shiseido.co.jp/HPLC/

■販売代理店

NO.17-5000-2011.4